

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Enely Õispuu

***pheBA* OPERONI ESINEMINE IDA-VIRUMAA JÕGEDEST ERALDATUD
MIKROOBIKOOSLUSE DNAs**

Bakalaureusetöö

Juhendaja PhD Eve Vedler

TARTU 2013

Sisukord

Sisukord.....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS.....	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1 Aromaatsete ühendite katabolism	5
1.2 Bioaugmentatsioon Ida-Virumaal	6
1.3 <i>pheBA</i> operoni kodeeriva piirkonna struktuur.....	7
1.4 <i>pheBA</i> operoni redetekteerimine Ida-Virumaa jõgedes.....	8
1.5 <i>Pseudomonas fluorescens</i> biotüüp F tüve PC20 üldisloomustus	9
1.6 Horisontaalne geeniülekanne	10
2. EKSPERIMENTAALOSA	12
2.1 Töö eesmärgid	12
2.2 Materjal ja meetodika.....	12
2.2.1 Proovide kogumine ja filtreerimine.....	12
2.2.2 DNA eraldamine	13
2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	13
2.2.4 Töös kasutatud bakteritüved ja praimerid	14
2.2.5 PCR produktide visualiseerimine, kontrollimine ja puhastamine	15
2.2.6 Sekveneerimine	15
2.2.7 Sekveneeritud järjestuste analüüs.....	16
2.3 Tulemused ja arutelu	16
2.3.1 <i>pheA</i> geeni ja 16S rRNA-d kodeeriva geeni tuvastamine koosluse DNAst	16
2.3.2 <i>pheBA</i> operoni olemasolu tuvastamine veeproovidest	17
2.3.3 <i>pheBA</i> operoni ehituse kindlaksmääramine	18
2.3.4 Tüve PC20 plasmiidide olemasolu tuvastamine proovipunkti number 3 mikroobikoosluses.....	20
KOKKUVÕTE.....	23
SUMMARY	24
KASUTATUD KIRJANDUS	25

KASUTATUD LÜHENDID

bp – aluspaar

BSA – veise seerumi albumiin

C12O – katehooli 1,2-dioksügenaas

ExoI – eksonukleas I

HGT – horisontaalne geeniülekanne

IR – pöördkordusjärjestused

IS – insertsioonilised järjestused

MGE – mobiilne geneetiline element

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon

PH – fenooli hüdroksülaas

SAP – kreveti aluseline fosfataas

SISSEJUHATUS

Kindla piirkonna mikroobikooslus ning selle mitmekesisus sõltub suurel määral keskkonnatingimustest. Elukeskkonna seisund määrab, millised omadused annavad mikroobidele eluks vajaliku eelise. Inimtegevusega kaasneb peaaegu alati mõju loodusele. Kirde-Eestis on keskkonda kõige enam mõjutavaks teguriks põlevkivi kaevandamise ning töötlemisega kaasnev keskkonnasaaste. Põlevkivi termilise töötlemise tagajärjel tekkinud poolkoks kogutakse kokku mägedeks. Jäätmetest välja valguvas vees on kõrge aromaatsete ühendite kontsentratsioon. Vesi sisaldab suurel hulgal fenooli, dimetüülfenooli, kresooli ja resortsinooli. Need ühendid suunatakse koos nõrgveega, läbi kogumiskanalite, lähedal asuvatesse jõgedesse, kust nad jõuavad lõpuks Läänemerre.

Kõrge aromaatsete ühendite kontsentratsiooniga keskkonnas suudavad edukalt elada organismid, kelle energia- ja süsinikuallikaks on fenoolsed ühendid. 1988.-1989. aastal toimus Kirde-Eesti põlevkivikaevanduses maa-alune põleng, mille tekitatud reostuse kõrvaldamiseks otsustati kasutada kahte laboratoorset mittepatogeenset fenooli lagundavat *Pseudomonas*'e tüve, mis sisaldasid fenooli lagundamiseks vajalikke võtmeensüüme kodeerivat *pheBA* operoni. 1993.-1995. aastal võetud veeproovide analüüsimine näitas, et antud operon või selles sisalduvad geenid esinesid piirkonna jõgede mikroflooras ka aastaid hiljem. Bioaugmentatsioonil kasutatud esialgsete tüvede säilimise kohta ei leitud kindlaid tõendeid. Sellest on võimalik järeldada, et *pheBA* operon on horisontaalse geeniülekanne teel kandunud kohalikesse bakteritüvedesse.

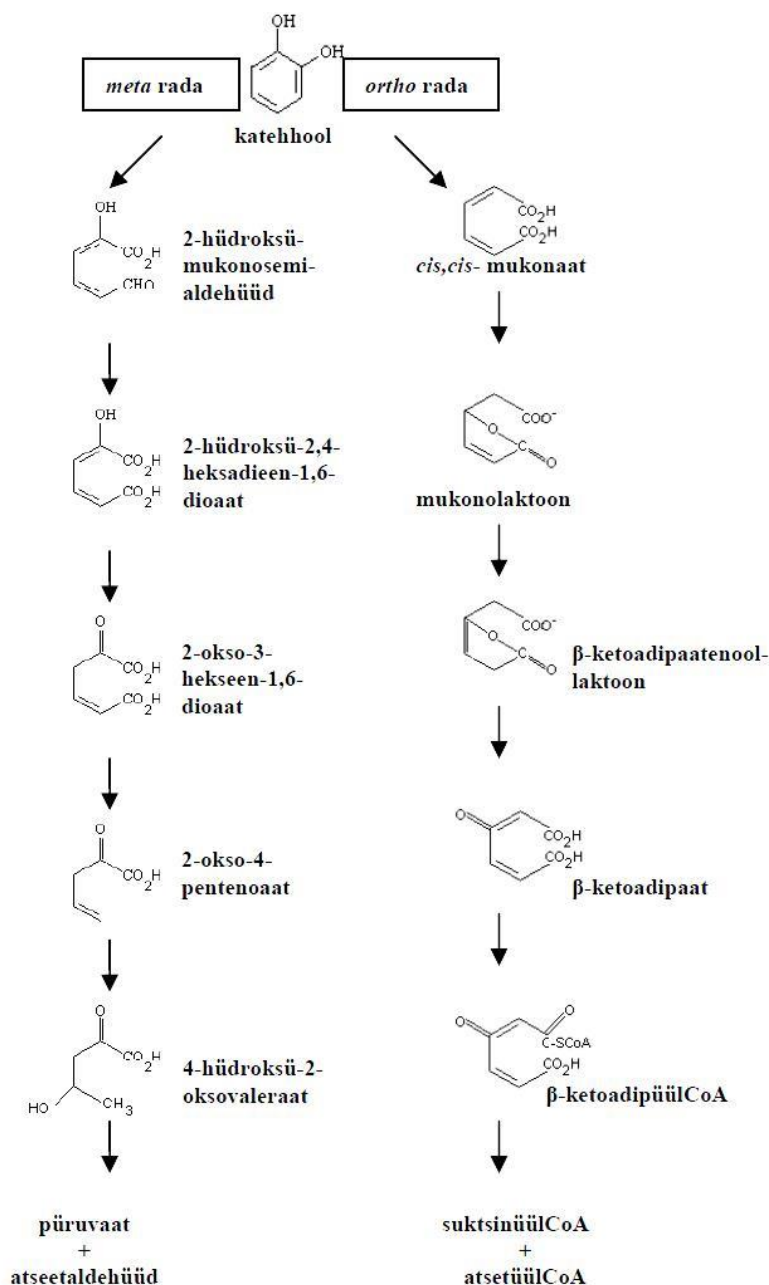
Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on uurida, kas *pheBA* operoni esineb endiselt Ida-Virumaa jõgede mikroobikoosluses. Selle eesmärgi saavutamiseks võetakse uued veeproovid, eraldatakse nendest mikroobikoosluse täielik DNA, milles uuritakse *pheBA* operoni esinemist polümeraasi ahelreaktsiooni abil spetsiifiliste praimeritega. Positiivse tulemuse korral määratakse ka saadud fragmentide nukleotiidsed järjestused.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Aromaatsete ühendite katabolism

Kirde-Eesti poolkoksimägesid ümbritseva piirkonna vesikeskkond on rikastunud fenooli ja *p*-kresooliga. Need on põlevkivi- ja keemiatööstuse kõrvalproduktideks (Peters jt., 1997). Mõned bakterid suudavad neid aineid lagundada. Kõige rohkem on selles suhtes uuritud perekonna *Pseudomonas* esindajaid. Mitmesuguse struktuuriga aromaatsete ühendite esialgne lagundamine toimub mitmetes perifeersetes lagundamisradades, millest tekkivaid tsentraalseid vaheühendeid ei ole palju (Diaz, 2004). Esmalt oksüdeerivad mono- või dioksügenaasid aromaatses ühendi ühe või kahe hapniku aatomi sisestamisega hüdroksüülrühma näol. Näiteks fenooli lagundamine katehooliks toimub fenooli monooksügenaasi (fenooli hüdroksülaas, EC 1.14.13.7, PH) toimel. Viimast ensüümi leidub nii ühe- kui mitmekomponendilisena. Vaheühenditeks võivad olla erinevad dihüdroksüaromaatsed ühendid (protokatehuaat, katehhool, gentisaat). Nende vaheühendite edasine lagundamine toimub enamasti *ortho* või *meta* lagundamisrajas (Joonis 1), kuid on ka erandeid. Saaduseks on Krebse tsükli vaheühendid. Dioksügenaasid katalüüsivad aromaatses ringi avamise molekulaarse hapniku sisestamisega benseeni tuuma kahe süsiniku aatomi vahele (Williams ja Sayers, 1994). Asendusrühmadeta või kloori sisaldavad aromaatsed ühendid lagundatakse *ortho* rajas (Schmidt jt., 1985). Bakteris *Pseudomonas putida* on *ortho* lagundamisrajas katehooli ja protokatehuaadi lagundamiseks kaks paralleelset haru (Dagley ja Patel, 1957). Katehooli aromaatses rõnga lõhustumist katalüüsib katehooli 1,2-dioksügenaas (C12O, EC 1.13.11.1) ja protokatehuaadi korral protokatehuaadi 3,4-dioksügenaas (EC 1.13.11.3). Metüülseid asendusrühmi sisaldavad aromaatsed substraadid lagundatakse tavaliselt *meta* rada pidi, kasutades katehooli 2,3-dioksügenaasi (EC 1.13.11.2).

Pseudomonas sp. tüves EST1001, millest on pärit antud töös uuritav *pheBA* operon, toimub fenooli lagundamine *ortho* rada pidi. *pheBA* operon plasmiidis pEST1001 kodeerib ühekomponendilist PHd ja C12Od.



Joonis 1. Katehooli lagundamise *meta* ja *ortho* rajad.

1.2 Bioaugmentatsioon Ida-Virumaal

1988. aasta novembrist kuni 1989. aasta veebruarini toimus Ida-Virumaal Estonia põlevkivikaevanduses maa-alune tulekahju, mille kustutamine tõi endaga kaasa tuhandeid tonne aromaatsete ühenditega saastunud vett. Vesi pumbati kaevandusest lähedal asuvasse jõgedesse, mis suubusid Peipsi järve ja Läänemerre. Bioaugmentatsiooni eesmärgil vabastati 1989. aasta märtsis saastunud veega piirkonda fenooli lagundavad *Pseudomonas putida* PaW85 laboratoorsed bakteritüved (Peters jt., 1997). Nendes bakteritüvedes esines *pheBA*

operon, mis on pärit multiplasmiidest *Pseudomonas sp.* tüvest EST1001. EST1001 on *Pseudomonas sp.* tüvest S13 tekkinud derivaat, millel vanemtüvega võrreldes puudub võime kasvada ksüleeni sisaldaval söötmel, kuid säilinud on toluuadi, fenooli ja salitsülaadi kasutamine. (Kivisaar jt., 1989). Tüve S13 on *m*-toluaadiga rikastatud mullaproovist eraldanud ning laborile kinkinud P. A. Williams (Kivisaar jt., 1989). Kuna operon pole kohaliku päritoluga, ei ole vaja uuringutes arvestada juba varasema võimaliku loomuliku looduses esinemisega. Operoni geenid sisestati *Pseudomonas putida* PaW85 tüvesse konjugatsiooni teel (Kivisaar jt., 1990).

1.3 *pheBA* operoni kodeeriva piirkonna struktuur

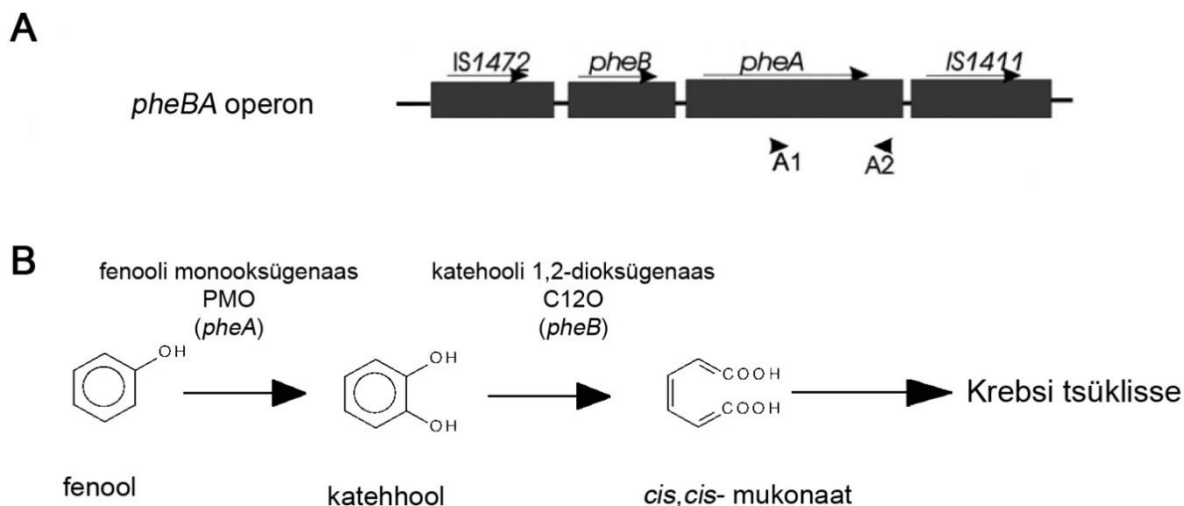
1989. aastal loodusesse viidud laboratoorsed tüved sisaldasid plasmidi *pheBA* operoniga, mis pärines *Pseudomonas sp.* tüvest EST1001. Biolagundamisega seotud geenid külgnevad tihti insertsiooniliste järjestustega (IS elementidega). See suurendab geenide vahetumise tõenäosust erinevate mikroorganismide vahel (Tsuda jt., 1999). C12Od kodeeriv *pheB* ja PHd kodeeriv *pheA* asuvad kahe erineva IS elemendi, IS1472 ja IS1411, vahel (Joonis 2). *pheB* ja *pheA* geenid kotranskribeeritakse sama promootori vahendusel. Operoni promootor asub *pheB* geeni ja sellele eelneva IS elemendi ees ning on homoloogne kromosomaalse *catBC* promootorregiooniga. *pheBA* geenide transkriptsiooni reguleerib LysR perekonda kuuluv transkriptsiooni regulaatorvalk CatR, mis reguleerib ka kromosomaalset *catBC* promootorregiooni (Kasak jt., 1993).

IS1411s asuv vasakpoolne pöördkordusjärjestus (IR) kattub *pheA* geeni 3' otsaga 21 nukleotiidi ulatuses.

Uurides operoni ümber paiknevaid alasid leiti, et teisel pool IS1472 asuv avatud lugemisraam on küllaltki homoloogne paljudes pseudomonaadides kodeeritavate CatR valkudega. *catR* geeni homoloogi translatsiooni startkoodon asub *pheBA* operoni promootorjärjestuse lähedal, kuid seda transkribeeritakse teistele geenidega võrreldes vastassuunas. Järelikult nende kahe geeni promootorpiirkonnad kattuvad mingil määral (Peters jt., 2004).

Osadest uuritud tüvedest leiti 240 bp (aluspaari) pikkune järjestus, mis nimetati ARM*phe*-ks (Joonis 4). Järjestusel on, sarnaselt IS elementidele, otstel 39 bp pikkused IRid. ARM*phe*'st leitud IRid on homoloogsed *pheBA* operoni vasakpoolses IS elemendis paikneva Tn1472 transposooni ehitusega (Peters jt., 1997).

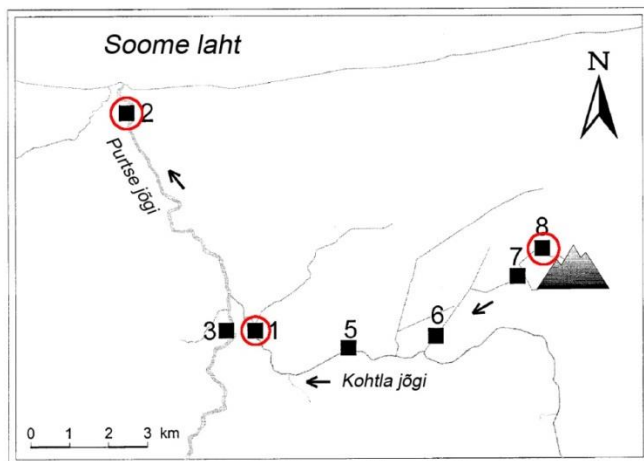
Lähtudes ARM*phe* ja *phe* järjestuste vahelise 15 bp pikkuse ala identsusest vastava alaga *catR* geenis, arvatakse, et *catR* geen oli olemas juba algses plasmiidis ning ARM*phe* on sisestatud sellesse hiljem (Peters jt., 2004).



Joonis 2. A. *pheBA* operoni ehitus, praimerite *pheA1* ja *pheA2* asukohad. B. Operoni geenide poolt kodeeritud ensüümide funktsioonid fenooli lagundamisrajas.

1.4 *pheBA* operoni redetekterimine Ida-Virumaa jõgedes

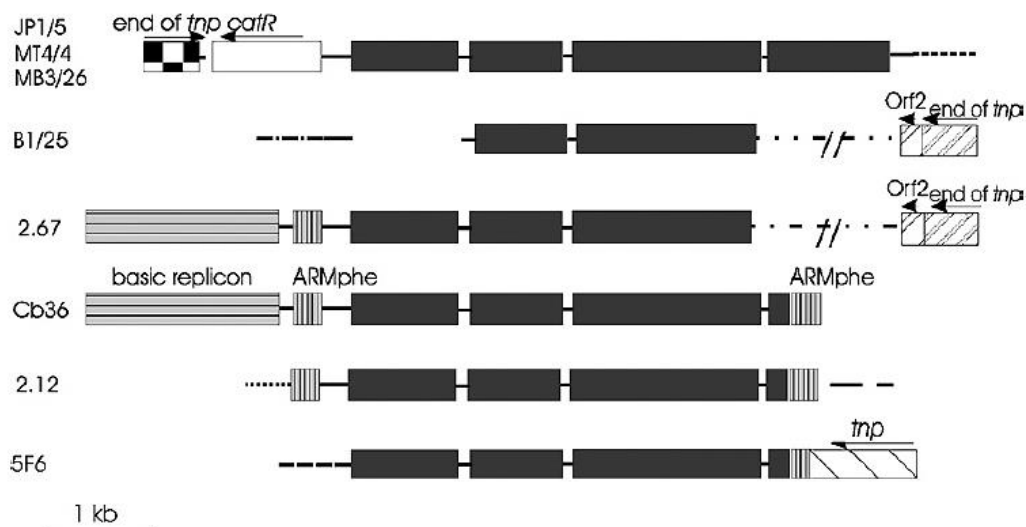
Ida-Virumaa jõgedest võetud veeproovidest (Joonis 3) isoleeriti aastatel 1993-1995 39 bakteritüve, mis omavad kolme eri tüüpi katabolismiradu (Heinaru jt., 2000). Eraldatud tüvedest 11 omasid *pheBA* operoni.



Joonis 3. Proovipunktid (1-8) aastatel 1993-1995. Ringiga märgitud punktides leiti *pheBA* operon.

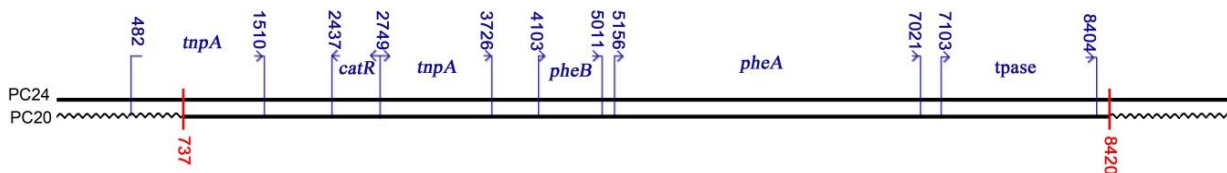
Peters jt. uurisid põhjalikult üheksat tüve, mis suutsid fenooli lagundada. Uuringutel kasutati hübriidiseerimiseks algele *pheBA* operonile vastavaid järjestusi. Positiivse kontrollina kasutati *P. putida* tüve 1412 geene. Kõigil tüvedel leiti sama promootorpiirkond ja geenid *pheB* ja *pheA*, nagu algsel *pheBA* operonil (Joonis 2). Neljal tüvel oli kogu järjestus sama, kuid osadel tüvedel puudus üks või mõlemad IS elemendid ning ühel tüvel esinesid *phe*

geenid kromosomaalselt. Samas ei suudetud tõestada, et ükski leitud tüvi oleks algselt vabastatud PaW85 derivaat (Peters jt., 1997).



Joonis 4. Leitud *pheBA* operonide erinevad ehised. *pheBA* operoniga identsed järjestused on märgitud tumedate kastidega, identsed mittekodeerivad piirkonnad ühtlaste joontega. Mittekodeerivad alad on märgitud katkendjoontega. Identsed alad on märgitud sama tähistusega.

Käesolevaks ajaks on meie töörühmas täielikult sekveneeritud kahe aastatel 1993-1995 usoleeritud baketeritüve, PC20 ja PC24 *pheBA* operoni sisaldavad DNA piirkonnad. Mõlemad tüved sisaldavad terviklikku *pheBA* elementi koos külgnevate IS elementide ja *catR* geeniga (Joonis 5). Tüves PC24 on *pheBA* kodeeritud kromosomaalselt, tüves PC20 aga plasmiidis pPHE20 (avaldamata andmed).

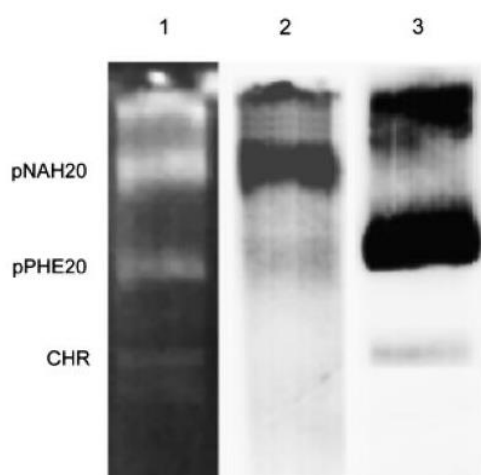


Joonis 5. Tüvedes PC20 ja PC24 oleva *pheBA* operoni ja ümbritsevate alade ehitus. Punasega on märgitud piirkonna koordinaadid, mis on kahel tüvel identsed, sinisega geenid ning nende koordinaadid toodud fragmendil. Laineline joon tähistab tüve PC20 genoomset konteksti, mis on erinev tüve PC24 omast.

1.5 *Pseudomonas fluorescens* biotüüp F tüve PC20 üldiseloomustus

P. fluorescens tüvi PC20 on ainsa energia- ja süsinikuallikana võimeline kasutama nii fenooli ja *p*-kresooli kui ka mõningaid teisi toksilisi aromaatsesid ühendeid (Heinaru jt., 2000). Antud tüvi sisaldab kahte plasmidi: pPHE20 ja pNAH20. Plasmiidide suurused on vastavalt 39 606 bp ja 83 042 bp (Heinaru jt., 2009, avaldamata andmed). PC20 isoleeriti proovipunktist

number 1 (Joonis 3) 1994. aastal. See tüvi ekspresseerib kahte paralleelset lagundamisrada aromaatsse tuuma avamiseks – nii *ortho* kui *meta* rada. Hübridisatsioonil selgus, et *meta* ja *ortho* rada katalüüsivad geenid asuvad erinevates plasmiidides (Joonis 6). Nende kahe plasmidi täieliku nukleotiidjärjestuse määramine kinnitas saadud tulemusi. Fenooli lagundatakse selle tüve poolt plasmiidil pPHE20 asuva *pheBA* operoni geenide poolt kodeeritud valke kasutades. Naftaleeni lagundamiseks vajalikke valke kodeeritakse plasmiidis pNAH20 olevatelt geenidelt. pNAH20 on konjugatiivsete omadustega ning võimeline iseseisvaks konjugatsiooniks. pPHE20 vajab konjugatsiooniks plasmiidilt pNAH20 poolt kodeeritavaid valke.



Joonis 6. PC20 plasmiidne profiil (rida 1), PC20 Southern blot hübridisatsioon *nahH* geeni prooviga plasmiidist NAH7 (rida 2), *pheA* geeni prooviga plasmiidist pEST1412 (rida 3). CHR tähistab kromosomaalset DNAd.

1.6 Horisontaalne geeniülekanne

Geenide horisontaalsel ülekandel (HGT, ingl. k. *horizontal gene transfer*) on tähtis osa mikroorganismide geneetilises rikastamises. Tihti toimubki bakterite genoomide evolutsioon mitte mutatsioonide, vaid geenide ülekande kaudu. Selleks, et omandatud geenid jääksid organismi genoomi püsima, peavad nad andma peremehele mingi kasuliku omaduse antud keskkonnas esinevate tingimuste suhtes (Lawrence, 1999). HGT kaudu omandatakse tihti antibiootikumide resistentsuse, patogeensuse ning biolagundamisradadega seotud geenid. Need geenid annavad eelise kindlas keskkonnas. Antibiootikumide resistentsuse ja biolagundamisega seotud geenid asuvad tihti mobiilsetel geneetilistel elementidel (MGEdel), milleks on põhiliselt plasmiidid, IS elemendid ja transposoonid (Top jt., 2002). Kataboolsed geenid asuvad tihti IS elementide vahel, see soodustab geenide integreerumist (Tsuda jt., 1999).

HGTks bakterite vahel on kolm peamist võimalust:

- konjugatsioon – vajab rakk-rakk kokkupuudet, enamus looduses esinevatest HGTdest toimub sellisel viisil. Plasmiidid võivad üle kanduda iseseisvalt või vajada selleks teiste (konjugatiivsete) plasmiidide abi.
- transformatsioon – bakterirakk peab olema võimeline rakuvälise DNA vastuvõtmiseks ning selle sisestamiseks enda genoomi.
- transduktsioon – toimub bakteriviiruste ehk bakteriofaagide vahendusel. Bakteri genoomi järjestused pakitakse koos viiruse geenidega partiklisse ning viiakse uude peremeesrakku.

Need ülekandeviisid esinevad looduses ning neid on võimalik ka laboratoorselt tekitada.

Konjugatsiooni puhul on tähtis näiteks doonoraku seisund, samuti keskkond – toitainete puuduse korral on konjugatsiooni tõenäosus väiksem. Ülekanduv plasmiid peab ekspresseerima ülekandeks vajalikke geene (*tra* geene) (Dröge jt., 1999). Iseseisvalt ülekanduvad plasmiidid omavad *oriT* järjestust, mis on DNA ülekande alguspunktiks. Nad kodeerivad ka vajalikke valke rakkudevahelise ühenduse loomiseks. Sellistel plasmiididel on lai peremeesring, mis muudab nad eriti tähtsaks bakterikoosluste rikastamisel uute geenidega. Transformatsioon sõltub vaba DNA olemasolust keskkonnas, rakkude võimest DNAd vastu võtta, raku ja vaba DNA vahelise sideme tekkimisest ning omandatud geenide ekspressioonivõime säilimisest (Lorenz ja Wackernagel, 1994). DNA vabaneb keskkonda tavaliselt rakkude lüüsumise tagajärjel. Enamasti lagundavad keskkonnas olevad DNAasid vaba DNA, kuid osa molekule võib jääda terveks ning kinnituda savi või liiva osakestele (Paget jt., 1992). Mõned looduses esinevad bakterid on püsivalt kompetentsed (suudavad pidevalt vastu võtta keskkonnas esinevat vaba DNAd), teistel tagab DNA omandamise näiteks toitainete ja mikroelementide vähesus kasvukeskkonnas (Lorenz ja Wackernagel, 1991). Osadel bakteritel on välja kujunenud lühikesed nukleiinhappe järjestused, mille esinemise korral toimub seostumine membraanile. Selline süsteem tähendab, et soodustatakse liigisisest DNA vahetust (Dubnau, 1991).

Transduktsiooni toimumise tõenäosus on väiksem võrreldes teiste HGT võimalustega, sest bakteriofaagidel on piiratud peremeesring ning bakterid on võimelised kiiresti muteeruma, et takistada faagide sisenemist rakku (Davison 1999).

Kui omandatav DNA sisaldab homoloogilisi järjestusi kompetentse raku genoomis, saab toimuda homoloogiline rekombinatsioon (Strätz jt., 1996). Kui homoloogia puudub või piirdub mõne nukleotiidiga, siis ei saa homoloogilist rekombinatsiooni kasutada. Sellisel juhul on võimalik kasutada ülekannet, mis ei vaja DNA molekulide ühendamiseks identseid nukleotiide (transpositsioon IS-elementide ja transposoonide vahendusel).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

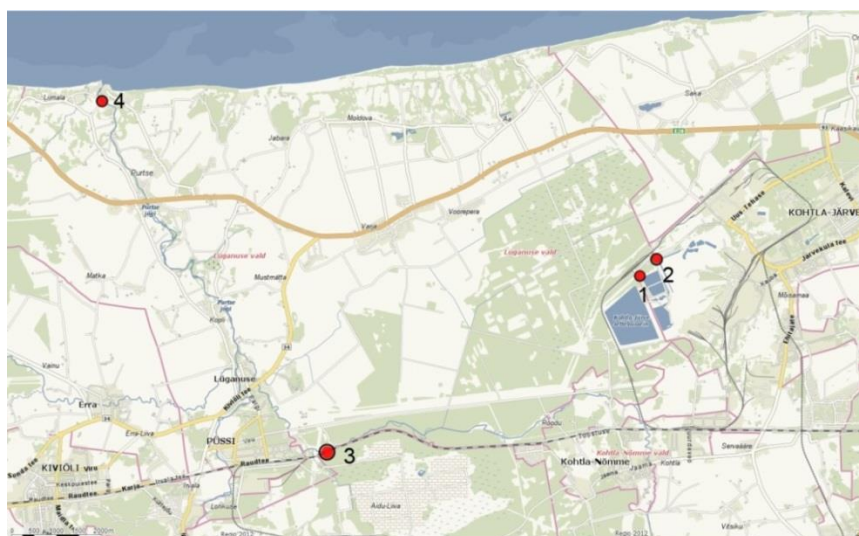
Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida *pheBA* operoni esinemist Ida-Virumaa jõgedes, kuhu 1989. aastal viidi sisse *Pseudomonas putida* PaW85 laboratoorsed tüved, mis sisaldasid nimetatud operoni.

Antud bakalaureusetöö eesmärgi saavutamiseks oli vajalik uute veeproovide võtmine, millele järgneb nendest mikroobikoosluse täieliku DNA eraldamine. Eraldatud DNAs uuritakse spetsiifiliste praimeritega PCRi abil *pheBA* operoni esinemist. Positiivse tulemuse korral määratakse saadud fragmentide nukleotiidsed järjestused sekveneerimise teel.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Proovide kogumine ja filtreerimine

Antud tööga seotud veeproovid võeti neljast proovipunktist Ida-Virumaal (Joonis 7). Proovide kogumine toimus 2012. aasta märtsis. Igast proovipunktist võeti vee pinnakihtidest 10 liitrit vett ning hoiti ühe päeva jooksul steriilses anumas +4°C juures. Seejärel filtreeriti vesi läbi steriilse 0,2 µm poori läbimõõduga filtri, kasutades mehhaanilist filtreerimist vaakumseadeldise abil. Ühele filterpaberile koguti 500 milliliitris vees olev materjal. Iga proovipunkti kohta filtreeriti 1,5 liitrit vett. Filterpaberid asetati 50 ml plasttuubi ja jäeti lahtise korgiga kuivama. Filtreid koos tuubidega säilitati -80°C juures. Filtreerimise eesmärk oli veeproovides sisalduvate mikroorganismide kogumine filtrile.



Joonis 7. Proovipunktid on märgitud punaste ringidega ning tähistatud numbritega 1-4.

2.2.2 DNA eraldamine

DNA eraldamiseks filtritele kogutud mikroorganismidest kasutati *PowerSoil™ DNA Isolation Kit*'i (*Mo Bio Laboratories*) ning vastavat tootja protokoll. Antud DNA eraldamise komplekt on mõeldud keskkonnaproovidest geneetilise materjali eraldamiseks ning on meie töörühmas samaks otstarbeks ka varasemalt kasutatud. Eraldasin igalt filtrilt eraldi DNA. DNA eraldamiseks kasutasin igast filtrist 1/4, mis vastab 125 ml veeproovile.

Proovipunkti number 3 kahe filtri puhul tegin erandi, et kontrollida, milline tuleb DNA kontsentratsioonide erinevus, kui kasutada eraldamiseks suuremat osa filtrist. Selleks kasutasin kahe filtri 1/4-s olnud DNA eraldamiseks sama eraldustuubi. Seoses sellega vastab joonisel 8 rida 3.3 250 ml olnud koosluse DNAle. Iga kogumistuubi filtrile kogutud DNA elueeriti 100 µl elueerimispuhvris.

2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCRi kasutati filtritelt eraldatud mikroobikoosluse täielikust DNAST soovitavate fragmentide amplifitseerimiseks.

Reaktsioonisegu (toodud on lõppkontsentratsioonid), lõppmahuga 25 µl, sisaldas PCRi puhvrit [75mM Tris-HCl, pH 8,8; 20mM (NH₄)₂SO₄-MgCl₂; 0,01% Tween 20], veise seerumi albumiini (BSAd) lõppkontsentratsiooniga 0,12 mg/ml, 2,5 mM MgCl₂, 20 pmol kumbagi praimerit, segu neljast dNTPst (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), iga nukleotiidi 0,2 mM, 0,02U/µl termoresistentset polümeraasi *Thermus aquaticus*'e *Taq* DNA polümeraasi (Fermentas, Leedu). BSAd kasutati võimalike inhibiitorite mõju vähendamiseks. Filtritelt eraldatud DNA vesilahust lisati reaktsioonisegudesse maksimaalne võimalik kogus (st. vett reaktsioonisegudesse ei lisatud), kuna DNA kontsentratsioon oli eeldatavalt võrdlemisi madal. Referentstüvede puhul kasutati külviplaatidelt kogutud mikroobikolooniate lüsaati. Söötmetelt võeti väike kogus biomassi ning suspendeeriti 25 µl deioniseeritud vees. Lüüsimiseks kasutati *Eppendorf Mastercycler* PCR masinat. Lüüsiiti 15 minutit 96°C juures. Lüüsitud rakud sadestati proovituubi põhja tsentrifuugimisega 13000 pöörde juures viie minuti jooksul. Tekkinud supernatanti, koos rakkudest vabanenud DNAGA, kasutati PCR reaktsiooni märklaud DNAna. Iga reaktsiooni jaoks kasutati 2 µl supernatanti.

PCRi reaktsioonid viidi läbi 0,2 ml proovituubides *Eppendorf Mastercycler* PCR masinas.

PCR programm:

1. Matriits-DNA ja praimerite kaksikahela denaturatsioon 95°C juures 5 minutit.
2. Kaksikahelate denaturatsioon 95°C juures 1 minut.

3. Praimerite seondumine DNAGA 45 sekundit, temperatuurid on märgitud Tabelis1.
4. Uue ahela süntees 72°C juures 1,5 minutit.
5. Punktid 2 - 4 kordusid 40 tsükli.
6. Lõppinkubeerimine 10 minutit 72°C juures.

2.2.4 Töös kasutatud bakteritüved ja praimerid

Töös kasutatud PCR praimerid on toodud Tabel 1 ning *pheBA* operoni sisaldavad referentstüved Tabel 2.

Tabel 1. PCR reaktsioonides kasutatud praimerid

Sihthärg geen	Nimetus	5'→3' järjestus	t°C*	Produkti suurus	Viide
<i>pheA</i>	pheA1 pheA2	CAGGATCGAATATCGGTGGCCTCG CTTCACGCTGGCGTAACCAATCGC	61	947 bp	Heinaru jt., 2000
Fragment 1	pheBA1F_24 pheBA1F_20 pheBA1R	ATGGCAGGACGCTTACGCAG AATTGGATCAATGTCCTCAAGC GCAGGCAGATGATCAGCTCC	57	635 bp	Käesolev töö
Fragment 2	pheBA2F pheBA2R	CAGACCAAGAAGGGAAACCAG GGCATAACCACCTAGCGCAAC	57	600 bp	Käesolev töö
Fragment 3	pheBA3F pheBA3R	TCATCAGCATCTAACCACGC ACGCTGTGTAGTCATGGTCG	57	375 bp	Käesolev töö
Fragment 4	pheBA4F pheBA4R	ATCTCCAGCGATGCCTTGCG ATGCATGGCTAGGTGATGCG	57	750 bp	Käesolev töö
Fragment 5	pheBA5F pheBA5R	ATGCATGGCTAGGTGATGCG CTCTGCACAAAGATGTTGTCC	57	540 bp	Käesolev töö
Fragment 6	pheBA6F pheBA6R_24 pheBA6R_20	CGCTACTGACTCGGATCAGC CAGCTAGGTCTGTGCCTTGG ATGATCACTCTCAGGTAGACG	57	560 bp	Käesolev töö
16S rRNA	PCRI PCRII	AGAGTTTGATCATGGCTCAG TACGGTTACCTTGTTACGACTT	53	~1500 bp	Vedler jt., 2000
pG20 <i>repA</i>	Rep20_älgus RepD_älgus	AGTTTGCGTGATCCAGGTCG ACCATGATGCGGAATCGGTC	57	1180 bp	Käesolev töö
pNAH20 <i>repA</i>	IncP9_Fw IncP9_Rev	CMCARCGCGGYACWTGGG ** GTCGGCAICTGCTTGAGCTT	53	400 bp	Jutkina jt., 2011 Greated jt., 1999

pPHE20 spetsiifiline	3_3 SepR	TGCAGTTTCCCAGTGCCTGC AAGGAAGTCGGTCTGGCTCG	57	609 bp	Käesolev töö
-------------------------	-------------	--	----	--------	-----------------

* **Praimerite seostumistemperatuur**

** **Kõdunukleotiidide tähistused:** W, A või T; S, C või G; M, A või C; Y, C või T; K, G või T; R, A või G

Tabel 2. Töös kasutatud bakteritüvede üldiseloomustus

Bakteritüvi	Plasmiidid	Fenotüüp	Viide
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotüüp F tüvi PC20	pPHE20; pNAH20	Phe ⁺ p-Cre ⁺ Nah ⁺ Sal ⁺	Heinaru jt., 2000
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotüüp C tüvi PC24	pPHE24	Phe ⁺ p-Cre ⁺	Heinaru jt., 2000

2.2.5 PCR produktide visualiseerimine, kontrollimine ja puhastamine

PCRi produktide visualiseerimiseks kasutati geelelektroforeesi. 5 µl proovi segati 1 µl elektroforeesi värviga (0,1% broomfenoolsinine, 70% glütserool) ning kanti 0,8%-lisele agarosgeelile. Geeli valmistamiseks kasutati TAE puhvrit [50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8,2], agarosi pulbrit ja etiidiumbromiidi (0,5 µg/ml). Elektroforeesi vann täideti samuti TAE puhvriga. Suurusmarkerina produktide suuruse määramiseks kasutati 1kb DNA markerit (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*, Fermentas, Leedu). DNA fragmentide visualiseerimiseks kasutati UV valgust.

Kuna lisaks vajalikule fragmendile on PCRi produktis ka muud geneetilist materjali, siis võimalikult puhta DNA saamiseks peab fragmendi agarosgeelist välja lõikama. DNA geelist puhastamiseks kasutati *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen Inc., USA) ja toimiti tootja poolt koostatud protokollil alusel.

2.2.6 Sekveneerimine

Sekveneerimise teostati amplifitseeritud DNA lõigu nukleotiidse järjestuse määramiseks. PCRi produktidele teostati enne sekveneerimist tötluse, et eemaldada ja inaktiveerida kasutamata nukleotiidid ning praimerid. Tötluseks kasutati ensüüme ExoI (eksonukleas I, Fermentas, Leedu) ja SAPi (krevetil aluseline fosfataas, Fermentas, Leedu). ExoI lagundab seondumata primereid, kuna on üheaahelalise DNA-spetsiifiline eksonukleas. SAP eemaldab

dNTPde 5'-otsast kaks fofaatjääki. Töötlus toimus *Eppendorf Mastercycler* PCR masinas 37°C juures 15 minuti jooksul. Eksonukleaasi ja SAPi inaktiveerimiseks tõsteti temperatuur 15 minutiks 80°C juurde. Produktide säilitamine -20°C juures.

Eelnevalt geelist puhastatud PCRi produktidele ExoI ja SAP töötlust ei tehtud.

Sekveneerimiseks vajaliku lõigu amplifitseerimiseks kasutati *Terminator 3.1. Cycle Sequencing Kit*-i ja sellele vastavat protokoll (Applied Biosystems). Reaktsioonid viidi läbi *Eppendorf Mastercycler* masinas.

Programm:

- 1) Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 95°C juures 15 sekundi jooksul.
- 2) Praimeri seondumine sobival temperatuuril (Tabel 1) 15 sekundit.
- 3) DNA ahela pikendamine 60°C juures 45 sekundit.

Programm koosnes 40 tüklist. Proovid sekveneeriti automaatsekvenenaatoris *Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer*.

2.2.7 Sekveneeritud järjestuste analüüs

Sekveneeritud järjestuste analüüsiks kasutati arvutianalüüsi programmi BioEdit versiooni 7.1.3.0 (Hall, 1999). Andmeid võrreldi olemasoleva infoga PC20 ja PC24 *pheBA* operoni nukleotiidsetest järjestustest.

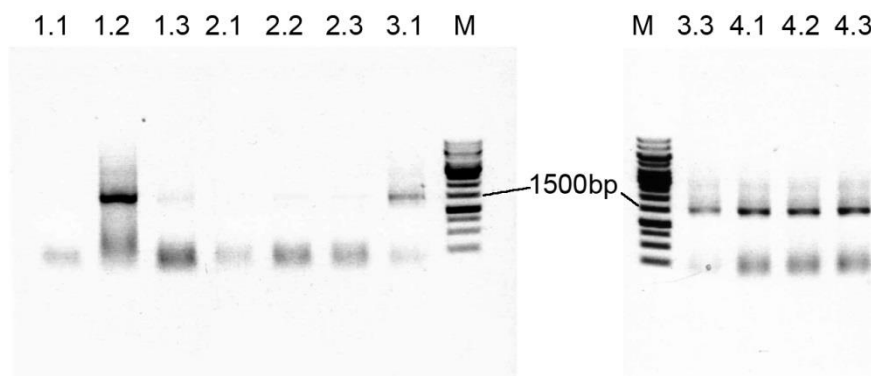
2.3 Tulemused ja arutelu

Käesolevas bakalaureusetöös kasutatud proovipunktide asukohavalik tugines meie töörühmas saadud varasematel tulemustel. Nagu peatükis 1.4 on kirjeldatud, leiti aastatel 1993-1995 proovipunktide 1, 2 ja 8 võetud veeproovidest tehtud väljakülvidest kokku 11 tüve, mis sisaldasid *pheBA* operoni. Oma proovipunktid (Joonis 7) valisime lähtudes sellest, et nendest punktidest on kõige suurema tõenäosusega võimalik ka praegusel ajal leida otsitavat operoni.

2.3.1 *pheA* geeni ja 16S rRNA-d kodeeriva geeni tuvastamine koosluse DNAs

Selleks, et kontrollida eraldatud mikroobikoosluse DNA intaktsust ning kontsentratsiooni, tegin kõigepealt PCRi reaktsioonid 16S rRNA-d kodeeriva geeni-spetsiifiliste praimeritega. Reaktsioonides kasutasin universaalseid primereid PCRI ja PCRII (Tabel 1), mida meie

töörühm on ka varasemalt kasutanud. PCRi reaktsiooni tegin igalt filtrilt eraldatud DNAGA eraldi. Saadud PCR tulemused on näha joonisel 8.

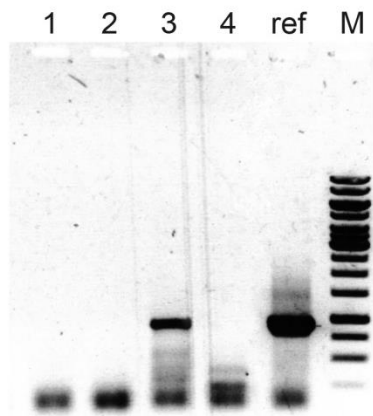


Joonis 8. 16S rRNA-d kodeeriva geeni detekteerimine veeproovidest. Numbritega 1.1-4.3 on tähistatud erinevatelt filtritelt eraldatud DNAST saadud PCRi produktid. Esimene number näitab proovipunkti, teine number mitmenda filtriga on tegemist. M tähistab suurusmarkerit (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*, Fermentas, Leedu).

Antud katse tulemusena saadi kõigist proovipunktidest 16S rRNA-d kodeeriva geeni universaalsete praimeritega kas siis tugevam või nõrgem produkt. Saadud fragmendi õigsuse kontrollimisel lähtuti produkti suurusest, mis on enamasti umbes 1500 bp. Selgus, et proovipunktides 1 ja 2 on DNA kontsentratsioon väiksem (erandiks on siin proov 1.2) kui punktides 3 ja 4, mis on ka kooskõlas sellega, et kahes esimeses proovipunktis oli visuaalsel hinnangul fenoolsete ühendite kontsentratsioon tunduvalt kõrgem kui punktides 3 ja 4. Kõrge fenoolsete ühendite kontsentratsioon inhibeerib bakterite kasvu, seega neis punktides on bakterite arvukus ilmselt tunduvalt väiksem võrreldes punktidega 3 ja 4. Lisaks inhibeervad fenoolsed ühendid ka PCR reaktsiooni, ja on võimalik, et lisatud BSA ei olnud piisav selle inhibitsiooni eemaldamiseks. Edasisteks katseteks valisin iga proovipunkti kohta välja ühe DNA proov, millega 16S rRNA-d kodeeriva geeni-spetsiifilised praimerid andsid kõige parema tulemuse.

2.3.2 *pheBA* operoni olemasolu tuvastamine veeproovidest

pheBA operoni esialgseks detekteerimiseks eraldatud veeproovide mikroobikoosluste täielikus DNA-s kasutasin geeni *pheA*-spetsiifiliste praimerite paari *pheA1* ja *pheA2* (Tabel 1), mille seostumiskoht on märgitud Joonis 2. Positiivseks kontrolliks kasutasin referentstüvena *Pseudomonas fluorescens* tüve PC20, mis sisaldab plasmiidil pPHE20 fenooli monooksügenaasi geeni *pheA*. Saadud PCRi tulemused on näha joonisel 9.

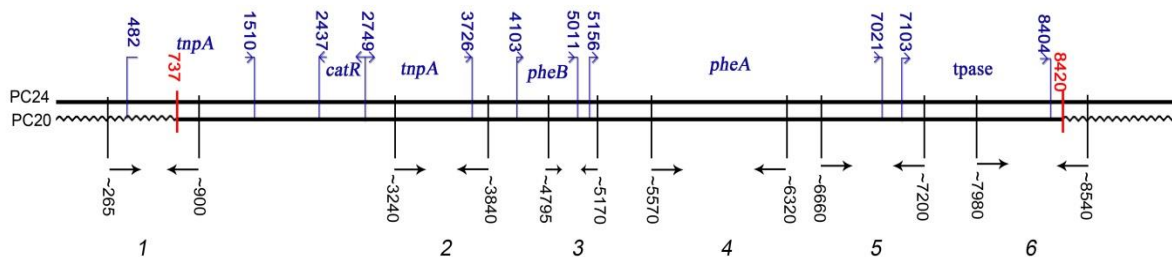


Joonis 9. PCR reaktsioon *pheA* geeni suhtes. Numbrid 1-4 vastavad proovipunktide numbritele. Ref-iga on tähistatud referentstüve PC20 PCRi produkt. M tähistab suurusmarkerit (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*, Fermentas, Leedu).

Tulemusena selgus, et *pheA* geeni leidis ainult kolmanda proovipunkti DNAs. Kuna tegemist on kogu mikroobikoosluse DNAGA, võis *pheA* geeni kandvaid tüvesid leida ka teistes punktides, kuid nende väikse osakaalu tõttu, ei pruukinud kasutatud meetod anda positiivset tulemust. Saadud positiivse tulemuse kontrollimiseks eraldas kolmanda proovipunkti õige pikkusega fragmendi geelilt ning teostas selle sekveneerimise. Sekveneerimine kinnitas saadud tulemust, millest võib järeldada, et proovipunkti number 3 mikroobikoosluse DNAs leidis *pheA* geeni järjestust. See tulemus oli ootuspärane, sest 1993.-1995. aastal võetud veeproovidest leiti *pheA* geeni omavaid tüvesid kõige rohkem (8 tüve) just samas piirkonnas asunud proovipunktist.

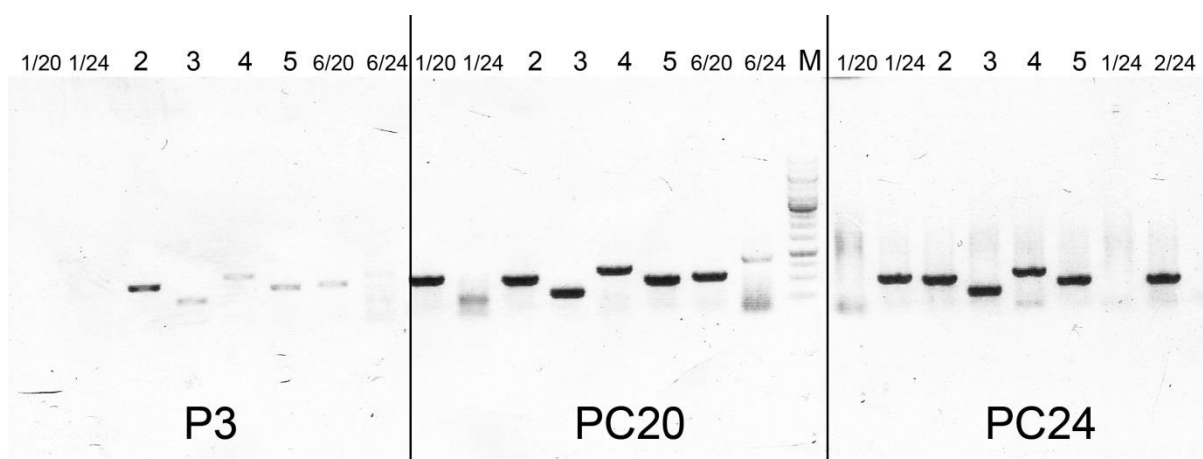
2.3.3 *pheBA* operoni ehituse kindlaksmääramine

Meie töörühma varasemate tööde käigus on täielikult sekveneeritud ainult *Pseudomonas fluorescens* tüvede PC20 ja PC24 *pheBA* operoni ning seda ümbritsevate alade järjestused. Võrreldes kahte tüve omavahel leiti, et ainus erinevus on operoni ümbritsevate alade vahel (Joonis 5). Sellest tulenevalt otsustati uurida, milline on proovipunktist number 3 (Joonis 7) leitud terve *pheBA* operoni sisaldava elemendi ehitus ning genoomne kontekst. Disainiti praimerid operoni äärealade jaoks ning ka operoni sees erinevate lõikude amplifitseerimiseks (Joonis 10). Praimeripaaride 1 ja 6 välimised, st erinevasse genoomsesse konteksti jäävad, praimerid tehti nii tüve PC20 kui PC24 järjestuste spetsiifilised.



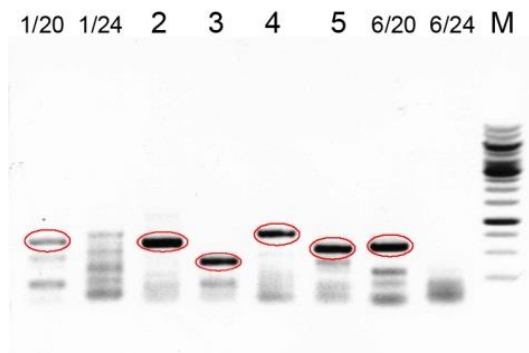
Joonis 10. Käesolevas töös disainitud praimerid *pheBA* operoni sisaldava piirkonna paljundamiseks. Mustaga on märgitud praimeripaaride numbrid ja koordinaadid. Noolekesed näitavad praimerite 5'-3' suunda. Punasega on märgitud piirkonna koordinaadid, mis on kahel tüvel identsed, sinisega geenid ning nende koordinaadid toodud fragmendil. Laineline joon tähistab tüve PC20 genoomset konteksti, mis on erinev tüve PC24 omast. Praimeripaaride 1 ja 6 välimised praimerid on disainitud nii tüve PC20 kui ka tüve PC24 spetsiifilised.

Kokku 8 erineva praimeripaariga teostati PCR analüüs nii proovipunkti number 3 koosluse DNA-ga kui ka positiivse kontrollina mõlema referentstüve DNaga. Saadud tulemused on esitatud joonisel 11.



Joonis 11. PCR analüüsi tulemused käesolevas töös disainitud praimeritega. Numbrid 1-6 tähistavad erinevaid praimeripaare, numbrid 20 ja 24 kaldkriipsu taga tähistavad vastavalt, kumma tüve genoomsele kontekstile spetsiifilist välist praimeripaari on kasutatud. P3 tähistab proovipunkti number 3 koosluse DNA-ga, PC20 ja PC24 vastavate tüvede lüsaatidega läbiviidud PCR analüüsi. M tähistab suurusmarkerit (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*, Fermentas, Leedu).

Katse tulemusena selgus, et kolmanda proovipunkti mikroobikoosluse DNast saadud fragmendid sarnanevad tüve PC20 fragmentide mustriga. Kuna vajalik oli ka fragmentide sekveneerimine, aga selleks olid saadud PCR fragmendid liiga madala kontsentratsiooniga, siis kasutati kolmandast proovipunktist tehtud PCRiprodukte matriitsina uue PCRi jaoks samade praimeritega. Saadud fragmendid on esitatud joonisel 12.



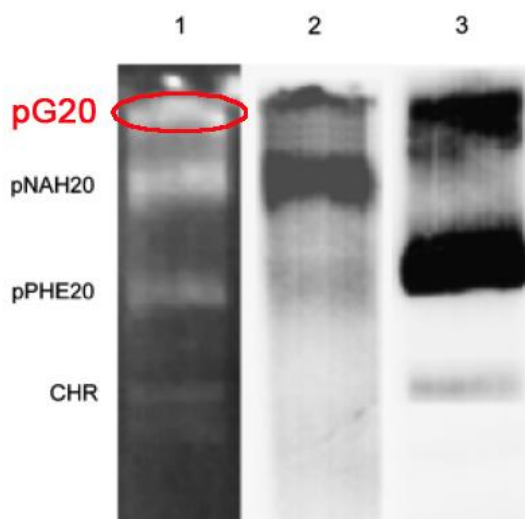
Joonis 12. Kordus-PCR analüüsi tulemused käesolevas töös disainitud praimeritega. Numbrid 1-6 tähistavad erinevaid praimeripaare, numbrid 20 ja 24 kaldkriipsu taga tähistavad vastavalt, kumma tüve genoomsele kontekstile spetsiifilist välist praimeripaari on kasutatud. M tähistab suurusmarkerit (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*, Fermentas, Leedu). Ringiga on märgitud geelist eraldatud fragmendid.

Tulemuseks olid selgemini eristuvad fragmendid, mida oli võimalik geelist välja lõigata. Geelist eraldatud DNAd kasutati sekveneerimiseks. Sekveneerimise tulemuseks olid puhtad homogeensed, tüve PC20 vastavate järjestustega identsed järjestused. Topeltpiike ei esinenud, mis näitab, et heterogeensust antud fragmentide osas ei leitud selle mikroobikoosluse DNAs.

2.3.4 Tüve PC20 plasmiidide olemasolu tuvastamine proovipunkti number 3 mikroobikoosluses

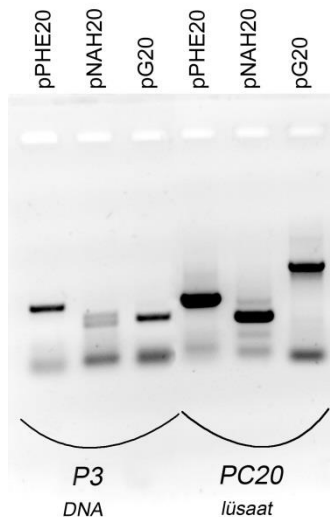
Kuna kolmanda proovipunkti mikroobikoosluse DNAST leitud *pheBA* operoni ning seda ümbritseva ala järjestus oli identne tüve PC20 vastavale järjestusele, ning tüves PC20 asub *pheBA* operon plasmiidil pPHE20. Otsustati teha kindlaks, kas selles mikroobikoosluses on võimalik detekteerida ka plasmidi pPHE20 selgroo olemasolu. Selleks disainiti praimeripaar selle plasmidi selgroo tundmatu funktsiooniga piirkonda. Selleks, et kindlaks teha, kas selles mikroobikoosluses võiks esineda ka tüve PC20 ennast, disainiti lisaks veel praimeripaarid teiste selle tüve plasmiidide, pG20 ja pNAH20 selgroopiirkonda (mõlema plasmidi puhul nende replikatsiooniks vajalikku *repA* geeni).

Esialgselt arvati, et tüves PC20 on kaks plasmidi, kuid praeguseks on selle tüve täisgenoomi sekveneerimisel selgunud, et see tüvi sisaldab ka kolmandat plasmidi pG20, mille suuruseks on 133 716 bp (Joonis 13).



Joonis 13. PC20 plasmiidne profiil (rida 1), PC20 Southern blot hübridisatsioon *nahH* geeni prooviga plasmiidist NAH7 (rida 2), *pheA* geeni prooviga plasmiidist pEST1412 (rida 3). CHR tähistab kromosomaalset DNAd. Ringiga on märgitud hiljem leitud plasmiid pG20.

Amplifitseerisin proovipunkti number 3 DNAd nimetatud kolme erineva praimeripaariga. Saadud PCRprodukte võrdlesin tüve PC20 lüsaadist saadud fragmentide mustriga. Tehtud PCRi tulemused on esitatud joonisel 14.



Joonis 14. PCR plasmiidide spetsiifiliste praimeritega. P3ga on tähistatud proovipunkti number 3 PCRi produktid.

PCRi tulemuste visualiseerimisel selgus, et kolmandas proovipunktis esineb tõenäoliselt ainult pPHE20 koos *pheBA* operoniga. Teistele plasmiididele vastavate praimeritega ei saadud õige suurusega fragmente. pPHE20le sobivate praimeritega saadud fragmendi lõikasin geelist välja ning sekveneerisin. Sekveneerimise tulemused kinnitasid, et proovipunktis number 3 esineb plasmiid pPHE20. Seega võib arvata, et selle plasmidi abil on *pheBA* operon

horisontaalsel teel levinud ja säilunud fenoolsete ühenditega reostunud jõevee mikroobikoosluses isegi veel 23 aastat pärast bioaugmentatsioonikatseid Ida-Virumaal. Järelikult annavad need kataboolsed geenid oma peremeesrakule eelise antud piirkonnas ellujäämisel.

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti, kuidas on säilinud 1989. aastal bioaugmentatsiooni käigus loodusesse viidud *pheBA* operon. Tavaliselt hävivad bioaugmentatsiooniks kasutatud bakteritüved loodusliku valiku tõttu küllaltki lühikese aja jooksul. Ida-Virumaa looduses esineb suurel hulgal erinevaid aromaatsaid ühendeid. Antud operon kodeerib fenooli lagundamiseks vajalikke valke. Kuna varasemalt on näidatud, et antud operon on samas keskkonnas püsinud vähemalt 6 aastat, võib eeldada, et operonis sisaldunud kataboolsed geenid annavad antud piirkonna elutingimustes bakteritele kasuliku eelise. Tingimused Ida-Virumaa Soome lahte suubuvates jõgedes ei ole palju muutunud, siit ka oletus, et *pheBA* operoni võiks seal endiselt leiduda.

Uuest veeproovidest selgus, et *pheBA* operoni leidub kõige rohkem Kohtla jõest võetud veeproovis. Kuna kasutati terve mikroobikoosluse DNAd, ei saa väita, et teistes proovipunktides ei esine operoni kandvaid tüvesid – neid võib olla lihtsalt liiga väheses koguses. Tulemus oli ootuspärane, kuna eelmistes uuringutes isoleeriti lähedal asuvast proovipunktist kõige rohkem *pheBA* operoni omavaid bakteritüvesid. Koosluse DNAST leitud *pheBA* operoni ehitust võrreldi samast piirkonnast varem eraldatud *P. fluorescens* tüves PC20 esineva operoni ehitusega ning leiti, et nende nukleotiidne järjestus on identne. Sellest tulenevalt uuriti koosluse DNAd andud tüves esinevate plasmiidide suhtes, mille nukleotiidne järjestus on teada. Kolmest plasmiidist saadi positiivne vaste ainult plasmiidile pPHE20, mida teati *pheBA* operon kandvat. Järelikult tüve ennast sellisel kujul enam ei eksisteerinud, vähemalt mitte koosluse DNAs tuvastatavana. Küll aga on Kohtla jõe mikroobikoosluses säilinud *pheBA* operoni kandev plasmiid pPHE20.

Laboris tehtud katsetega on suudetud saavutada funktsionaalne operon, mille ehitus on säilinud püsivana 23 aastat. Sellest võib järeldada, et niikaua, kui Ida-Virumaa jõgedes leidub suuremas koguses fenoolseid ühendeid, võib seal leida ka *pheBA* operoni või äärmisel juhul selles sisalduvaid geene.

THE EXISTENCE OF *pheBA* OPERON IN THE MICROBIAL COMMUNITY DNA EXTRACTED FROM EASTERN VIRUMAA RIVERS

Enely Õispuu

SUMMARY

The aim of this study was to investigate survival of the *pheBA* operon that was introduced into environment during bioaugmentation in 1989. Usually bacterial strain designed in laboratory and used for bioaugmentation will not survive more than few weeks because of abiotic and biotic stress. There are large amount of aromatic compounds in the environment of Eastern Virumaa. This operon encodes genes necessary for phenol degradation. It can be assumed that the catabolic genes of the operon give a useful advantages for the bacteria in that environment since the operon have survived there atleast 6 years. Conditions in Eastern Virumaa rivers flowing into Gulf of Finland have not changed much. Thus it could be assumed that the *pheBA* operon might still be detectable in that area.

New tests performed in this study showed that the *pheBA* operon existed in large amounts in the water sample taken from the Kohtla River. Strains bearing that operon may also occur in other sample points but their concentration may be too low to detect them in the community DNA. That result was not suprising, since previous studies isolated most bacterial strains expressing phenol monooxygenase from nearby sampling point. The structure of the *pheBA* operon found from community DNA was compaired to the structure of the operon found in a previously extracted strain *P. fluorescens* PC20 and these operons were found to be identical. Microbial community DNA was examined to detect three plasmid the strain PC20 is known to carry. Only one of the three plasmids was detected - the same plasmid pPHE20 that was known to carry *pheBA*. So it can be said that the strain itself in its original form no longer exists in that environment, or atleast were not detectable in community DNA.

The laboratory tests have achieved to form a functional operon that has kept a constant structure for 23 years. It can be assumed that as long as large amounts of phenolic compounds are found in the Eastern Virumaa rivers there can also be found the *pheBA* operon or its genes.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Dagley S., Patel M.D.** (1957). Oxidation of *p*-cresol and related compounds by a *Pseudomonas*. *Biochem. J.* 66, 227-233.
- Davison J.** (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42: 73-91.
- Dröge M., Pühler A., Selbitschka W.** (1999). Horizontal gene transfer among bacteria in terrestrial and aquatic habitats as assessed by microcosm and field studies. *Biol. Fertil. Soils.* 29: 221-245.
- Dubnau D.** (1991). Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 55: 395-424.
- Greated A., Thomas C.M.** (1999). A pair of PCR primers for IncP-9 plasmids. *Microbiology* 145, 3003-3004.
- Hall T. A** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis programm for Windows 95/98/NT. *Oxford University Press.* 41: 95-98.
- Heinaru E., Truu J., Stottmeister U., Heinaru A.** (2000). Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol- and *p*-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiology Ecology* 31: 195-205
- Heinaru E., Vedler E., Jutkina J., Aava M., Heinaru A.** (2009). Conjugal transfer and mobilization capacity of the completely sequenced naphthalene plasmid pNAH20 from multiplasmid strain *Pseudomonas fluorescens* PC20. *FEMS Microbiology Ecology* 70: 563–574
- Kasak L., Hõrak R., Nurk A., Talvik K., Kivisaar M.** (1993). Regulation of the catechol 1,2-dioxygenase- and phenol monooxygenase-encoding *pheBA* operon in *Pseudomonas putida* PaW85. *J. Bacteriol.* 175, 8038–8042.
- Kivisaar M., Habicht J., Heinaru A.** (1989). Degradation of phenol and *m*-toluate in *Pseudomonas* sp. strain EST1001 and its *Pseudomonas putida* transconjugants is determined by a multiplasmid system.. *J.Bacteriol.* 171:5111–5116.

- Kivisaar M., Hõrak R., Kasak L., Heinaru A., Habicht J.** (1990). Selection of independent plasmids determining phenol degradation in *Pseudomonas putida* and the cloning and expression of genes encoding phenol monooxygenase and catechol 1,2-dioxygenase. *Plasmid* 24:25-36.
- Lawrence J. G.** (1999). Gene transfer, speciation and the evolution of bacterial genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 519-523.
- Lorenz M. G., Wackernagel W.** (1991). High frequency of natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in soil extract supplemented with a carbon/energy and phosphorous source. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1246-1251.
- Lorenz M. G., Wackernagel W.** (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbial. Rev.* 58: 563-602.
- Nurk A., Kasak L., Kivisaar M.** (1991). Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene* 102: 13-18.
- Paget E., Monrozie L. J., Simonet P.** (1992). Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DnaseI and influence on gene transfer. *FEMS Microbiol. Lett.* 97: 31-39.
- Peters M., Heinaru E., Talpsep E., Wand H., Stottmeister U., Heinaru A., Nurk A.** (1997). Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, *pheBA*, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Applied and environmental microbiology*. Dec: 4899–4906
- Peters M., Tomikas A., Nurk A.** (2004). Organization of the horizontally transferred *pheBA* operon and its adjacent genomes in the eight indigenous *Pseudomonas* strains. *Plasmid* 52: 230–236
- Schmidt E., Bartels I., Knackmuss H.-J.** (1985). Degradation of 3-chlorobenzoate by benzoate or 3-methylbenzoate-utilizing cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 381-389.
- Strätz M., Mau M., Timmis K. N.** (1996). System to study horizontal gene exchange among microorganisms without cultivation of recipients. *Mol. Microbiol.* 22: 207-215.

Top E. M., Springael D., Boon N. (2002). Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bio augmentation of polluted soils and water. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42: 199-208

Tsuda M., Tan H. M., Nishi A., Furukawa K. (1999). Mobile catabolic genes in bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 401–410.

Vedler E., Koiv V., Heinaru A. (2000). Analysis of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pEST4011 of *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* strain EST4002. *Gene.* 255: 281-288.

Williams P.A., Sayers J.R. (1994). The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation.* 5: 195-217.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Enely Õispuu

(sünnikuupäev: 08.09.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

***pheBA* OPERONI ESINEMINE IDA-VIRUMAA JÕGEDEST ERALDATUD MIKROOBIKOOSLUSE DNAs**

mille juhendaja on PhD Eve Vedler

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013